

**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/19, C07K 14/52, A61K 38/19, G01N 33/53</b></p> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP94/04282</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>22. December 1994 (22.12.94)</b></p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 43 44 397.4      24. December 1993 (24.12.93)      DE P 44 27 395.9      3. August 1994 (03.08.94)      DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: <b>FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Blücherstrasse 5, D-30175 Hannover (DE).</b></p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>SCHULZ-KNAPPE, Peter [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). MEYER, Markus [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). MÄGERT, Hans-Jürgen [DE/DE]; Moltkeplatz 8, D-30163 Hannover (DE).</b></p> <p>(74) Anwälte: <b>MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Deichmannhaus am Hauptbahnhof, D-50667 Köln (DE).</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 95/18228</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>6. Juli 1995 (06.07.95)</b></p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: <b>AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ).</b></p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>
---	--

(54) Title: **HUMAN CIRCULATING CYTOKINE CC-1**

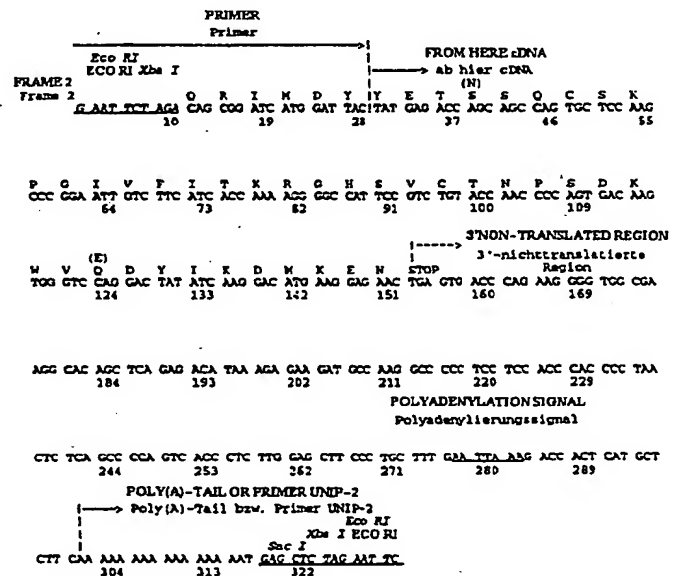
(54) Bezeichnung: **HUMANES ZIRKULIERENDES CYTOKIN CC-1**

(57) Abstract

A cytokine CC-1 having the following sequence of aminoacids and SEQ ID No. 6 is disclosed, as well as its biologically active fragments and/or derivatives, in particular its amidated, acetylated, phosphorylated and/or glycosylated derivatives.

(57) Zusammenfassung

Cytokin CC-1 mit der nachfolgenden Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 6 sowie dessen biologisch aktive Fragmente und/oder Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, phosphorylierte und/oder glycosylierte Derivate.



In der Peptidsequenz abweichende Aminosäuren sind in Klammern angegeben.

DEVIATING AMINOACIDS IN THE PEPTIDE SEQUENCE ARE GIVEN IN BRACKETS



### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam



### Humanes zirkulierendes Cytokin CC-1

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid aus der Klasse der Cytokine, Cytokin CC-1 sowie dessen biologisch aktive Fragmente und/oder Derivate, ein für das Cytokin CC-1 oder für seine biologisch aktiven Fragmente kodierendes Polynukleotid, insbesondere eine cDNA, ein Arzneimittel enthaltend das erfindungsgemäße Peptid, ein Diagnostikumittel, Verwendung von Cytokin CC-1 für zweite medizinische Indikationen sowie eine Nucleinsäuresonde hybridisierend für ein Polynukleotid kodierend für Cytokin CC-1 oder eines seiner Fragmente.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß sich aus humanem Hämofiltrat ein Cytokin CC-1 isolieren läßt. Das Cytokin hat die in SEQ ID No. 6 angegebene Aminosäuresequenz.

Auch Fragmente des Cytokins CC-1 weisen biologische Aktivität auf. Die Fragmente sind erhältlich durch dem Fachmann bekannte Methoden, beispielsweise durch Abdauung mit Peptidasen, insbesondere Endoproteasen. Auch Fragmentierung des erfindungsgemäßen Peptids mittels peptidbindungspaltender chemischer Reagenzien, insbesondere Cyanogenbromid liefert auch biologisch aktive Fragmente.



- 2 -

Das erfindungsgemäße Peptid ist erhältlich durch ein Isolationsverfahren ausgehend von humanem Hämofiltrat.

Das humane Hämofiltrat wird gegebenenfalls mit Wasser verdünnt und angesäuert. Der pH-Wert beträgt vorzugsweise 1,5 bis 3,5, insbesondere 2,5 bis 3,0. Danach wird das Hämofiltrat mit einem Kationenaustauscher behandelt, beispielsweise einem mit Sulfonsäuregruppen modifizierten Trägermaterial (Fractogel medium  $\text{SO}_3^-$  der Firma Merck). Die an den Kationenaustauscher gebundenen Peptide werden mit relativ hoch konzentrierter Salzlösung in einem sauren pH-Bereich, der dem obigen entspricht, eluiert. Die Ionenstärke der Elutionslösung entspricht dabei ungefähr einer 0,7 bis 1,3 molaren Natriumchloridlösung.

Das aufgefangene Eluat wird mit einem peptidfällenden Reagenz, beispielsweise Ammoniumsulfat versetzt. Die Ausfällung der Peptide erfolgt vorzugsweise bei niedrigeren Temperaturen, insbesondere im Bereich von 4 bis 10°C. Das so gewonnene Präzipitat wird von der überstehenden Lösung befreit, in Wasser aufgenommen und danach mit einem niederen peptidfällenden Alkohol, wie Isopropanol versetzt. Darin schließt sich eine weitere Kationenaustauscher-Chromatographie an. Diese Chromatographie ist vorzugsweise eine Gradientenelutions-Chromatographie mit einem Puffer geringer Ionenstärke bis zu einem Puffer mit höherer Ionenstärke entsprechend ungefähr einer Ionenstärke von 0,7 bis 1,3 M NaCl.

Die biologisch aktiven Fraktionen werden gepoolt und mittels präparativer Umkehrphasen-Chromatographie an mit C4 modifizierten Trägermaterialien weitergereinigt. Gegebenenfalls erfolgen weitere chromatographische Reinigungsschritte.

Die durch die chromatographische Reinigung erhaltene Substanz wurde der Strukturbestimmung zugeführt. Die Sequenzanalyse erfolgte über einen Edman-Abbau des Peptids sowie der Spaltprodukte und wurden über einen ABI 473 A Sequenzer durchge-



- 3 -

führt.

Aus der erfindungsgemäßen Peptidsequenz läßt sich ein Polynukleotid ableiten, kodierend für das Cytokin CC-1 (Fig. 1) mit dem C-terminalen Fragment gemäß SEQ ID No. 8 und der damit verbundenen Nukleinsäuresequenz SEQ ID No. 9.

Das Polynukleotid ist insbesondere eine cDNA, die sowohl als Ausgangspunkt einer gentechnischen Herstellung des Cytokins CC-1 dienen kann, wie auch als analytisches Werkzeug zum Nachweis des Auftretens von für das Protein kodierender DNA oder mRNA.

Dabei können entsprechende Derivate als Hybridisierungs sonden eingesetzt werden. Beispielsweise weist die cDNA, die für ein Fragment des erfindungsgemäßen Peptids kodiert, eine Sequenz gemäß SEQ ID No. 7 auf.

Neben der gentechnischen Herstellung ist auch die aufbauende Totalsynthese an üblichen Festphasen im Sinne der Merrifield-Synthese möglich. Die Synthesenstrategie und der Aufbau des Peptids mit den entsprechend geschützten Aminosäuren sind dem Fachmann bekannt.

Das erfindungsgemäße Peptid kann als Arzneimittel Verwendung finden. Seine biologische Aktivität entspricht der eines Cytokins. Es ist daher geeignet, als Arzneimittel bei den in Anspruch 7 genannten Indikationen eingesetzt zu werden. Das erfindungsgemäße Peptid kann dabei in für Peptide üblicher Weise parenteral, intravenös oder intramuskulär oder intranasal, bukal verabreicht werden. Die Menge an zu verabreichenden Peptid beträgt zwischen 10 und 3.000 µg pro Darreichungseinheit.

Das erfindungsgemäße Diagnostikum enthält poly- oder monoklonale Antikörper gegen das erfindungsgemäße Peptid gegebenenfalls in fluoreszenz- oder radioaktivmarkierter Form



- 4 -

um in an sich bekannten ELISA oder RIA Assays eingesetzt zu werden.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben.

#### Beispiel 1

500 l humanes Hämofiltrat wurden mit Wasser auf 2.000 l verdünnt und mit konzentrierter HCl der pH auf 2,7 eingestellt. Nach Auftrag auf eine Amicon-Vantage Säule (Füllmaterial Merck Fractogel medium  $\text{SO}_3^-$ ) wurden die gebundenen Peptide mit 1 M NaCl pH 3,0 eluiert.

Das Eluat (7 l) wurde mit Ammoniumsulfat versetzt und über Nacht die Peptide bei 4°C ausgefällt. Das Peptidpräzipitat wurde über einen Büchner-Filter filtriert.

Das gewonnene Präzipitat wurde in 2 l Wasser gelöst und mit 4,5 Teilen Isopropanol versetzt. Die ausgefällten Peptide wurden erneut über einen Büchner-Filter abfiltriert.

Das Präzipitat nach Isopropanol-Fällung wurde in 4 l Wasser gelöst und ein pH von 3,0 mit HCl eingestellt. Nach Auftrag auf einen Kationenaustauscher (Säule: Amicon Vantage) wurde die Säule eluiert und die Fraktionen gesammelt (Chromatogramm siehe Fig. 2).

#### Chromatographie-Bedingungen

Puffer A: 10 mmol Natriumdihydrogenphosphat pH 3,0

Puffer B: Puffer A mit 1 M NaCl

Gradient: 0 - 100 % B in 60 min.

Fluß: 40 ml/min

Detektion: 280 nm

Chromatographieanlage: Biopilot (Pharmacia)

Fraktionen: à 2 min ab Start des Gradienten



- 5 -

Die Fraktionen 31 bis 34 wurden zur weiteren Behandlung vereinigt.

Die gepoolten Fraktionen 31 bis 34 wurden sukzessive in zwei Chromatographie-Läufen über eine präparative Reverse-Phase Säule aufgetrennt (Chromatogram siehe Fig. 3 a und b).

#### Chromatographie-Bedingungen

Säule: 3 cm x 12,5 cm Stahlsäule

Füllmaterial: Parcosil RP-C4 25-45, 300 Å

Puffer A: 0,01 N HCl

Puffer B: Puffer A mit 30 % Methanol und 50 % Isopropanol

Gradient: 0 - 100 % B in 60 min.

Fluß: 15 ml/min

Detektion: 280/254 nm

Chromatographieranlage: BioCAD (Perseptive)

Fraktionen: à 1 min ab Start des Gradienten

Die Fraktionen 22 und 23 aus dem ersten präparativen Lauf sowie die Fraktion 24 des zweiten Laufes wurden gepoolt und das Lösungsmittel über einen Rotationsverdampfer abgezogen. Danach wurden die Fraktionen über eine semipräparative RP-C4 Säule aufgetrennt (Chromatogram siehe Fig. 4).

#### Chromatographie-Bedingungen

Säule: 1 cm x 12,5 cm Stahlsäule

Füllmaterial: Parcosil RP-C4 5 µ, 300 Å

Puffer A: 0,1 % TFA

Puffer B: Puffer A mit 80 % Acetonitril

Gradient: 0 - 30 % B in 60 min.

Fluß: 2 ml/min

Detektion: 214 nm

Chromatographieranlage: Kontron 322

Fraktionen: à 1 min ab Start des Gradienten



- 6 -

Die Fraktion 33 und 34 enthält die zu über 95 % aufgereinigte Substanz, die im folgenden in ihrer Struktur aufgeklärt wurde:

## Beispiel 2

### *Sequenz-Bestimmung*

Edman-Abbau des Peptids sowie der Spaltprodukte erfolgte über einen ABI 473 A Sequenzer nach Auftragen auf eine Polybrene-Membran in Mengen zwischen 100 und 400 pmol unter Verwendung des Standard-Programmes.

### *Bestimmung von Cysteinen*

$^{14}\text{C}$ -Carboxymethylierung und nachfolgende Aufreinigung über analytische Vydac C18 RP-Säule (4,6 mm x 25 cm). Detektion der carboxymethylierten Fraktion im Radioaktivitätsmonitor.

Nachfolgend Lys-C-Spaltung von 50 % des carboxymethylierten Peaks mit der Endopeptidase Lys-C. Die Spaltung erfolgte bei 37°C über 3 Stunden in den vom Hersteller (Boehringer, Mannheim) angegebenen Puffern bei einem Verhältnis von Enzym zu Peptid von 1:25. Die Spaltprodukte wurden über RP-Chromatographie mit einer analytischen Vydac-C18-Säule getrennt. Sammeln der einzelnen Peaks und Sequenzierung zur Komplettbestimmung der Sequenz.

### *Bestimmung des C-Terminus*

Die Spaltung der restlichen 50 % des carboxymethylierten Peptids erfolgt mit Chymotrypsin in den vom Hersteller (Boehringer, Mannheim) angegebenen Puffern bei einem Verhältnis von Enzym zu Peptid von 1:25, die nachfolgende Aufreinigung über analytische Vydac C18 RP-Säule (4,6 mm x 25 cm). Die einzelnen Peaks werden gesammelt und zur Komplettbestimmung der Sequenz analysiert.



- 7 -

### *Massenbestimmung*

Massenbestimmung des Gesamtpeptids erfolgt mit Sciex API III sowie der Fragmente nach Lys-C- und Chymotrypsinspaltung.

Sequenzierung und Massenbestimmung ergeben die oben angegebene Sequenz mit einer Masse von 8689 Dalton.

Ein Datenbankvergleich wurde durchgeführt an Swiss-Prot und EMBL-Peptid und Nukleinsäuredatenbank. Sequenzhomologie zu verschiedenen Mitgliedern der Superfamilie der Interchrine wurden festgestellt, dabei höchste Homologie zu Macrophage Inflammatory Protein MIP I alpha und MIP I beta.

### *Beispiel 3*

#### *Bestimmung der cDNA*

#### *Klonierung und Charakterisierung eines partiellen humanen Cytokin CC-1 cDNA-Fragmentes*

Aus humanen Nebennierengewebe wurde mit Hilfe eines automatischen Nukleinsäureextraktors (ABI, 340) Gesamt-RNA präpariert.

Aus 5 µg dieser RNA wurde die mRNA unter Verwendung von MMLV-RTase (Gibco-BRL) und eines synthetischen Oligo(dT)-Primers (UNIP-2, CCTGAATTCTAGAGCTCA(T)<sub>17</sub>) in cDNA-Erststrang umgeschrieben. Parallel dazu wurden ausgehend von der bekannten Peptid-Sequenz zwei "degenerierte" PCR-Primerpaare synthetisiert, welche sämtliche Codierungsmöglichkeiten für die entsprechenden Aminosäuresequenzen enthielten (siehe separates Blatt "CC-1-Aminosäuresequenz und abgeleitete PCR-Primer"). Das erste Primerpaar (CC-1-2/1, CC-1-2/2) war dabei in Bezug auf die Aminosäuresequenz eher N-terminal lokalisiert, während das zweite Primerpaar (CC-1-2/3, CC-1-2/4) nach C-terminal verschoben positioniert war. Dies sollte eine



- 8 -

Verstärkung in zwei Stufen (Vorverstärkung, Nachverstärkung) ermöglichen, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen. Folgende Reaktionen wurden durchgeführt:

1. In zwei verschiedenen Ansätzen wurden je 1/15 des cDNA-Ansatzes 40 PCR-Zyklen mit den Primerkombinationen CC-1-2/1 / UNIP-2 bzw. CC-1-2/2 / UNIP-2 unterzogen (Vorverstärkung, 2 Ansätze). Ein Zyklus bestand aus:

95°C	30 sec	Denaturierung
48°C	30 sec	Primer-Hybridisierung
72°C	3 min	Extension

2. Je 1/30 der beiden Ansätze wurde danach mit den Primerkombinationen CC-1-2/3 / UNIP-2 bzw. CC-1-2/4 / UNIP-2 in 20 Zyklen nachamplifiziert (Nachverstärkung, 4 Ansätze):

95°C	30 sec	Denaturierung
42°C	30 sec	Primer-Hybridisierung
72°C	2 min	Extension

Nachverstärkung mit CC-1-2/4 / UNIP-2 konnte ein homogenes PCR-Produkt erhalten werden (siehe "Agarosegelelektrophorese der PCR-Fragmente"). Der PCR-Ansatz wurde durch Centrikon C-100 (Amicon)- Zentrifugation von nicht umgesetzten Primern befreit, zusammen mit 50 ng pBluescript Eco-RI-restringiert (die PCR-Primer enthalten zur leichteren Klonierung Eco-RI-Schnittstellen) und anschließend ligiert. Die Ligationsprodukte wurden in E.coli XL-1 Blue propagiert, die Plasmid-DNA weißer Kolonien mit Qiagen-Säulen (Diagen) präpariert und mit Hilfe eines Fluoreszenzsequenzers sequenziert. Die klonierte cDNA kann nun als hochspezifische Hybridisierprobe zum Screening einer cDNA- oder Genbank eingesetzt werden. Ausgehend von der Sequenz können zudem spezifische Primer für eine direkte Amplifikation der restlichen cDNA aus Gesamt-DNA einer humanen cDNA-Bank abgeleitet werden.



- 9 -

## GAP-2-Aminosäuresequenz und abgeleitete PCR-Primer

## Primer

CC-1-2/4	SEQ ID No. 1,	+++! 48 Variationen
CC-1-2/1	SEQ ID No. 2,	768 Variationen
CC-1-2/3	SEQ ID No. 3,	24 Variationen
(kodierend für Fragment SEQ ID No. 4 GAP-2 AA-Seq.)		
CC-1-2/2	SEQ ID No. 5,	384 Variationen
CC-1-2/3	SEQ ID No. 6,	24 Variationen



- 10 -

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER:
  - (A) NAME: Prof. Dr. Wolf-Georg Forssmann
  - (B) STRASSE: Bluecherstrasse 5
  - (C) ORT: Hannover
  - (E) LAND: Deutschland
  - (F) POSTLEITZAHL: 30175
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Humanes zirkulierendes Cytokin CC-1
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9
- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
  - (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
  - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
  - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "PCR-Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCCCCGAATT CTAGACARCG NATHATGGAY TA

32

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "PCR-Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:



- 11 -

CCCGAATTCT AGAARTAYCC NATHCCNCGN CA

32

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "PCR-Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GCCCGGAATT CTAGACARAG RATHATGGAY TA

32

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Lys	Tyr	Pro	Ile	Pro	Arg	Glu	Arg	Ile	Met	Asp	Tyr
1				5					10		

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "PCR-Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN



- 12 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CCCGAATTCT AGAARTAYCC NATHCCNAGR CA

32

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 74 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

```

Thr Lys Thr Glu Ser Ser Ser Arg Gly Pro Tyr His Pro Ser Glu Cys
1           5           10           15
Cys Phe Thr Tyr Thr Thr Tyr Lys Ile Pro Arg Gln Arg Ile Met Asp
                20           25           30
Tyr Tyr Glu Thr Asn Ser Gln Cys Ser Lys Pro Gly Ile Val Phe Ile
          35           40           45
Thr Lys Arg Gly His Ser Val Cys Thr Asn Pro Ser Asp Lys Trp Val
          50           55           60
Gln Asp Tyr Ile Lys Asp Met Lys Glu Asn
65           70

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 123 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

```

TATGAGACCA GCAGCCAGTG CTCCAAGCCC GGAATTGTCT TCATCACCAA AAGGGGCCAT      60
TCCGTCTGTA CCAACCCCAG TGACAAGTGG GTCCAGGACT ATATCAAGGA CATGAAGGAG      120
AAC                                                123

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:



- 13 -

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 47 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Gln Arg Ile Met Asp Tyr Tyr Glu Thr Asn Ser Gln Cys Ser Lys Pro  
 1 5 10 15

Gly Ile Val Phe Ile Thr Lys Arg Gly His Ser Val Cys Thr Asn Pro  
 20 25 30

Ser Asp Lys Trp Val Gln Asp Tyr Ile Lys Asp Met Lys Glu Asn  
 35 40 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 330 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

GAATTCTAGA CAGCGGATCA TGGATTACTA TGAGACCAGC AGCCAGTGCT CCAAGCCCCGG 60  
 AATTGTCTTC ATCACCAAAA GGGGCCATTC CGTCTGTACC AACCCCAAGTG ACAAGTGGGT 120  
 CCAGGACTAT ATCAAGGACA TGAAGGAGAA CTGAGTGACC CAGAAGGGGT GCGGAAGGCA 180  
 CAGCTCAGAG ACATAAGAG AAGATGCCAA GGCCCCCTCC TCCACCCACC CCTAACTCTC 240  
 AGCCCCAGTC ACCCTCTTGG AGCTTCCCTG CTTTGAATTA AAGACCACTC ATGCTCTTCA 300  
 AAAAAAAAAA AAAAATGAGC TCTAGAATTC 330



P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Cytokin CC-1 mit der nachfolgender Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 6 sowie dessen biologisch aktive Fragmente und/oder Derivate, insbesondere amidierter, acetylierte, phosphorylierte und/oder glycosylierte Derivate.
2. Polynukleotid kodierend für Cytokin CC-1 nach Anspruch 1 und/oder dessen Fragmente.
3. Polynukleotid nach Anspruch 2 dadurch gekennzeichnet, daß dieses ein cDNA-Fragment gemäß SEQ ID No. 7 ist.
4. Verfahren zur Herstellung eines Cytokins-CC-1 gemäß Anspruch 1 durch Extraktion von Hämofiltrat, Kationenaustauscher-Extraktion, gefolgt von Elution der adsorbierten Substanzen,  
  
Ammoniumsulfat-Fällung der im Eluat vorhandenen Peptide und Proteine,  
  
Aufnahme des Präzipitats in wäßriger Lösung und erneute Fällung mit einem niederen Alkohol sowie Kationenaustauscher-Chromatographie, sowie Umkehrphasen-Chromatographie.
5. Arzneimittel enthaltend Cytokin CC-1 gemäß Anspruch 1 als wirksamen Bestandteil.
6. Diagnostikmittel enthaltend poly- oder monoklonale Antikörper gegen Cytokin CC-1 oder mit der für das Cytokin kodierenden Nukleinsäure oder mRNA.
7. Verwendung von Cytokin CC-1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Störungen der Migration



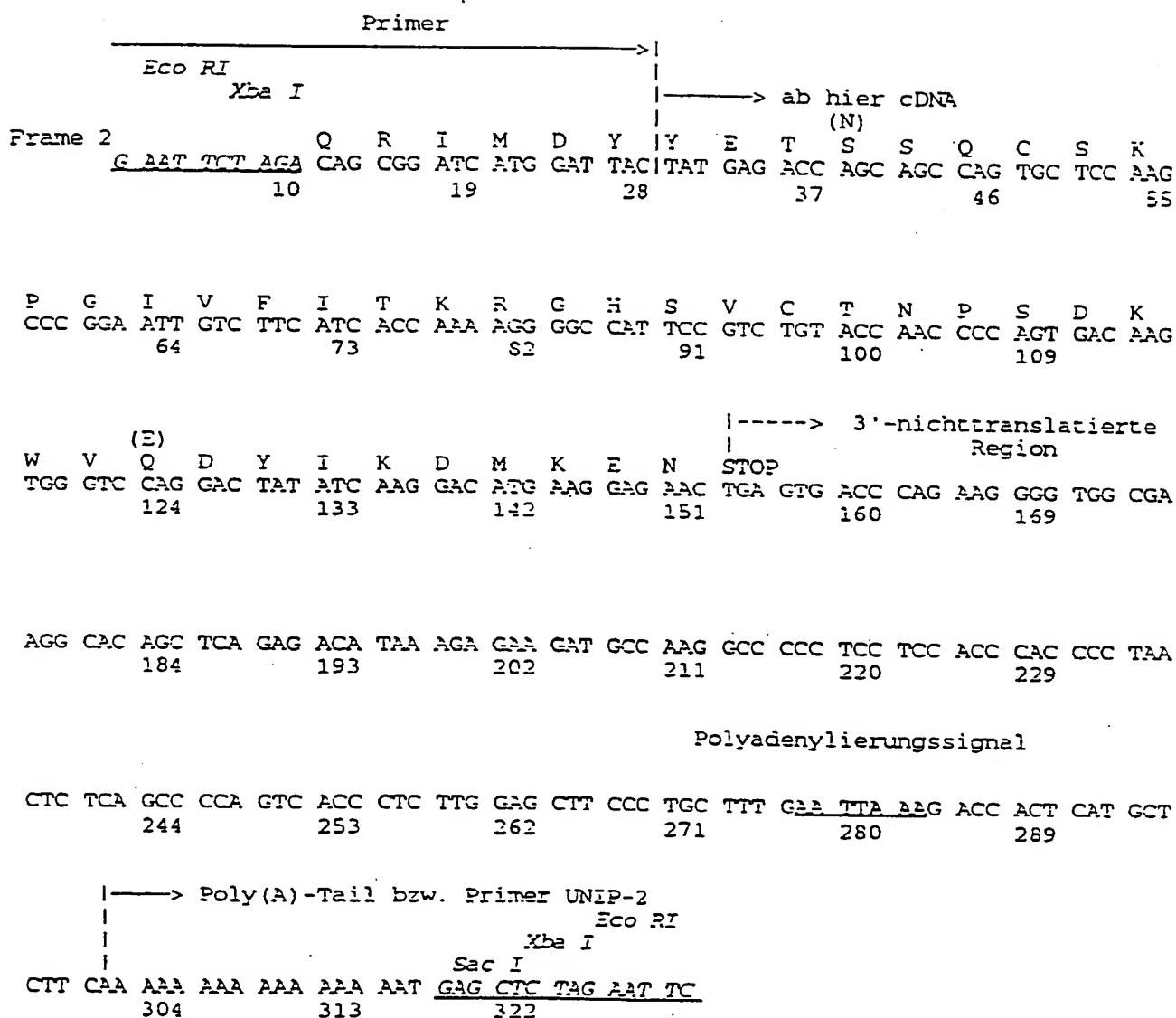
- 15 -

von Zellen, Erkrankungen des Immunsystems, Tumoren sowie Disfunktion regulatorischer Wachstumsfunktionen.

8. Nukleinsäuresonden hybridisierend mit einem Polynukleotid nach Anspruch 2.



- 1/5 -



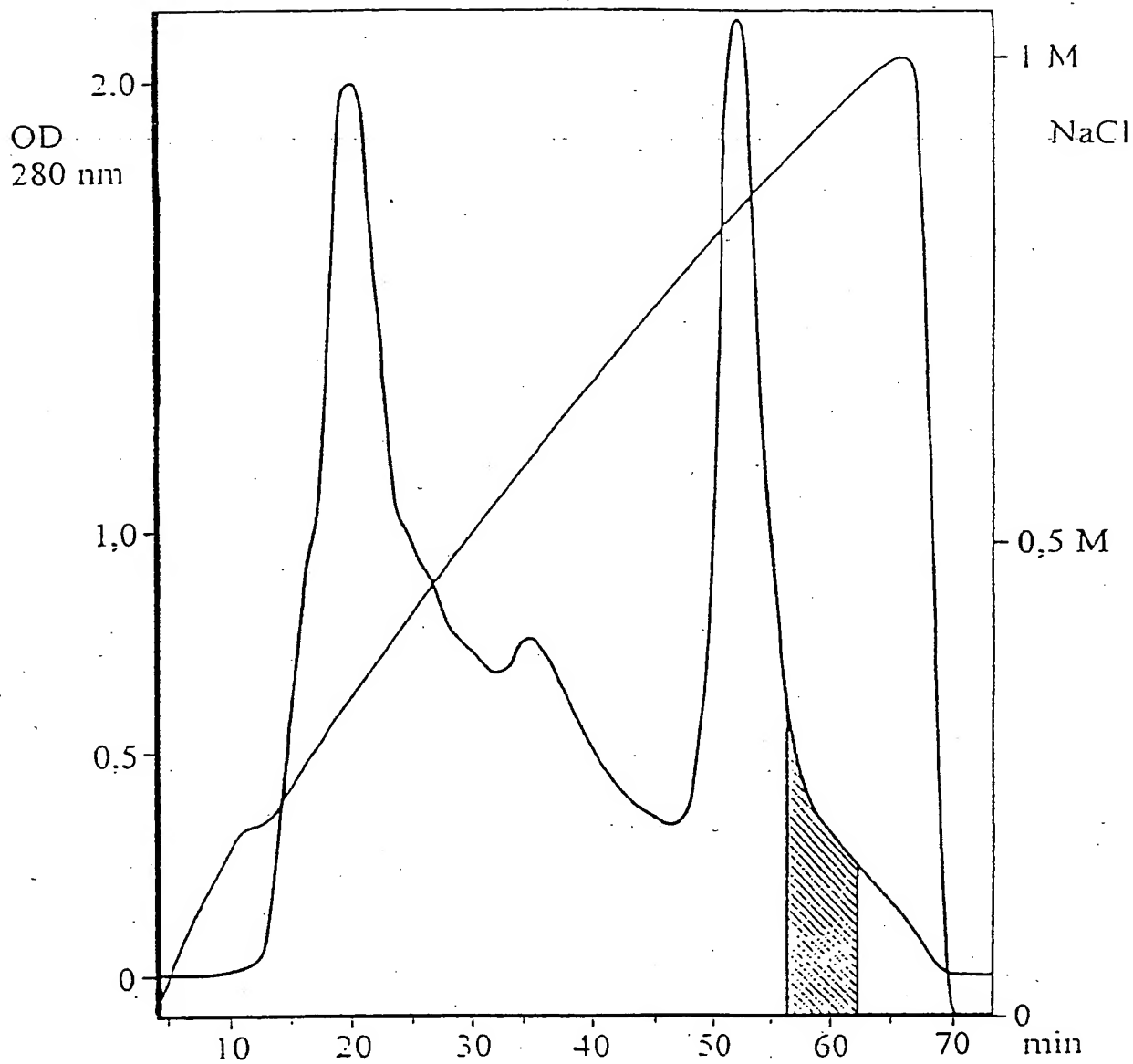
In der Peptidsequenz abweichende Aminosäuren sind in Klammern angegeben.

Figur 1

ERSATZBLATT (REGEL 26)



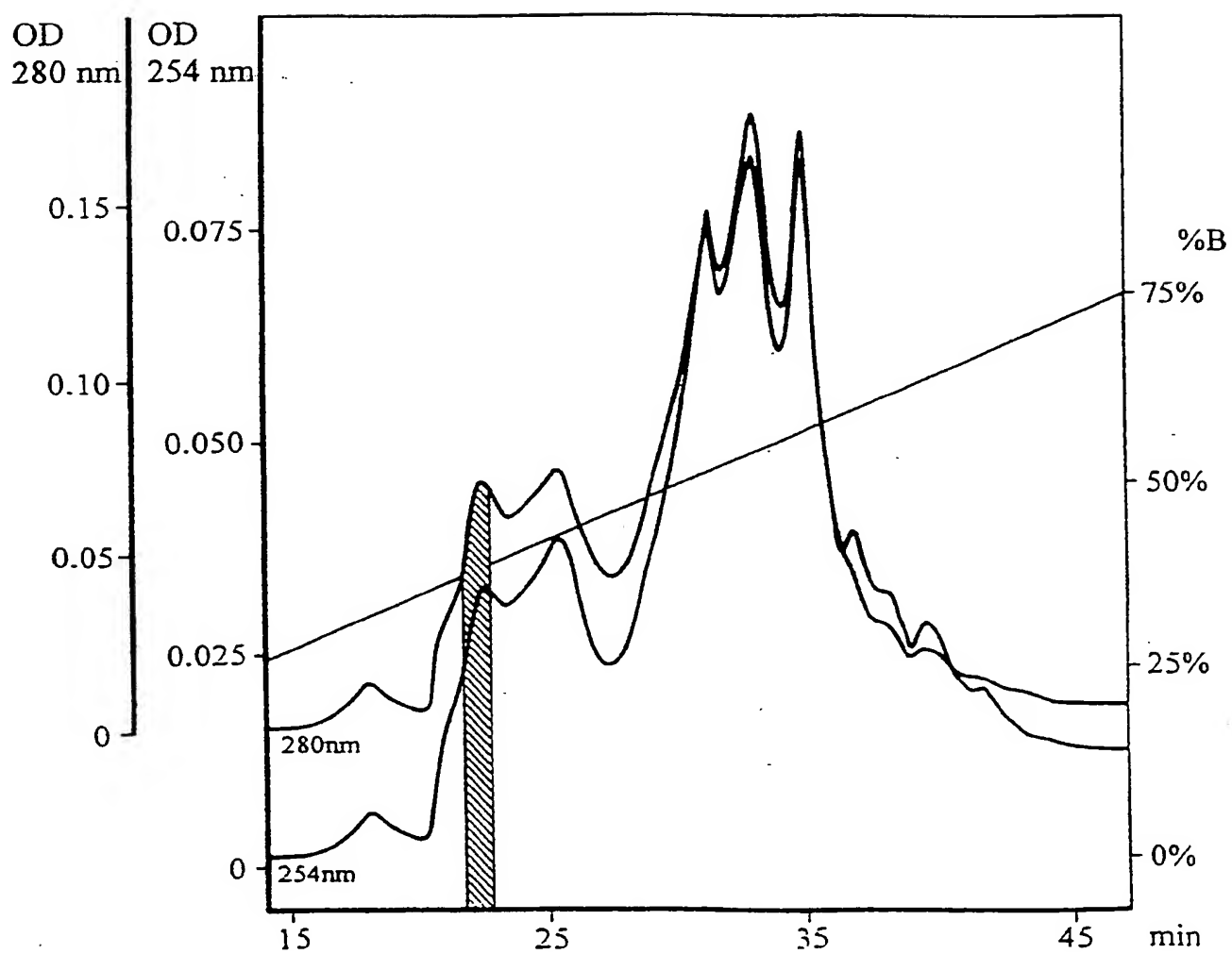
- 2/5 -



Figur 2



- 3/5 -

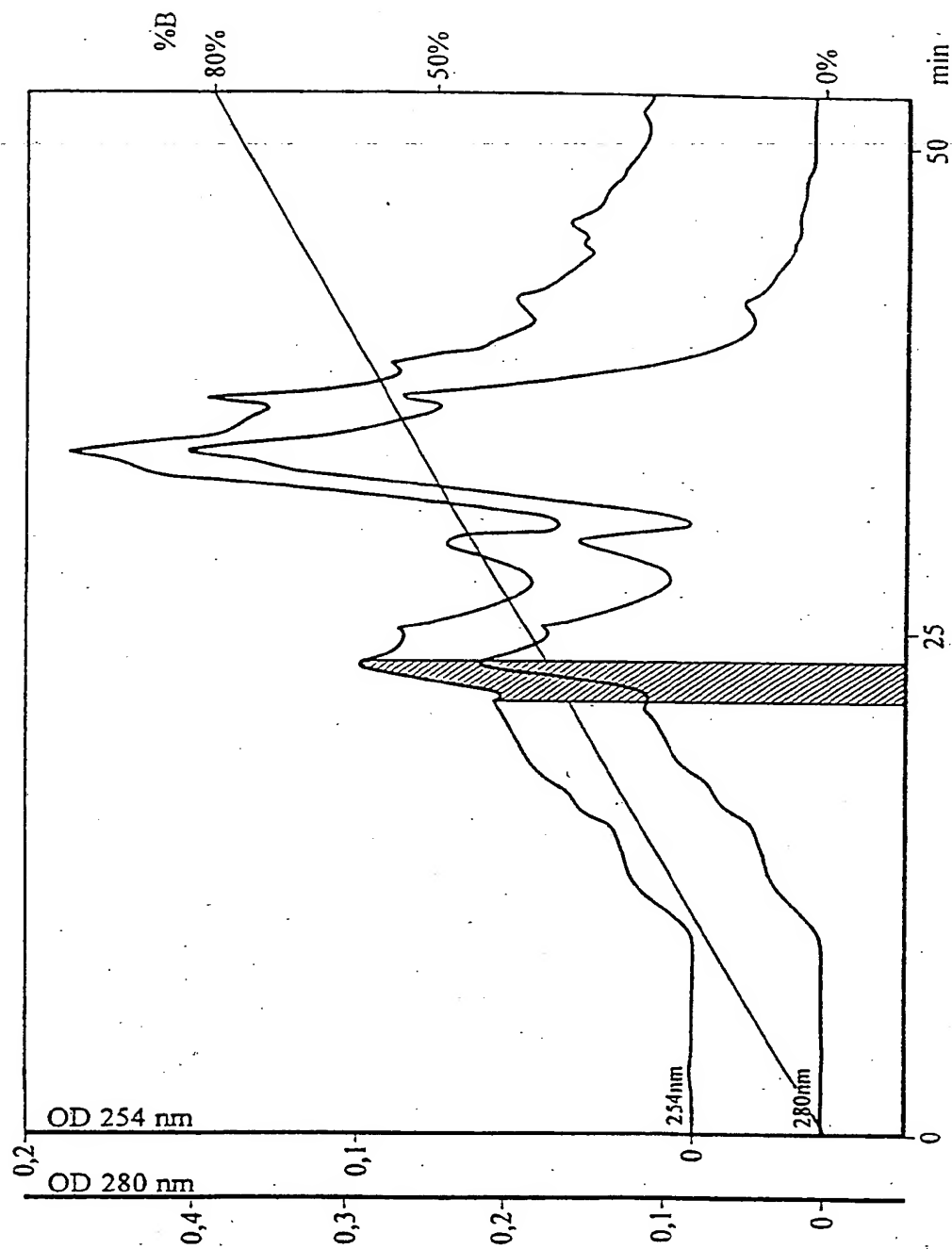


Figur 3a

ERSATZBLATT (REGEL 26)



- 4/5 -

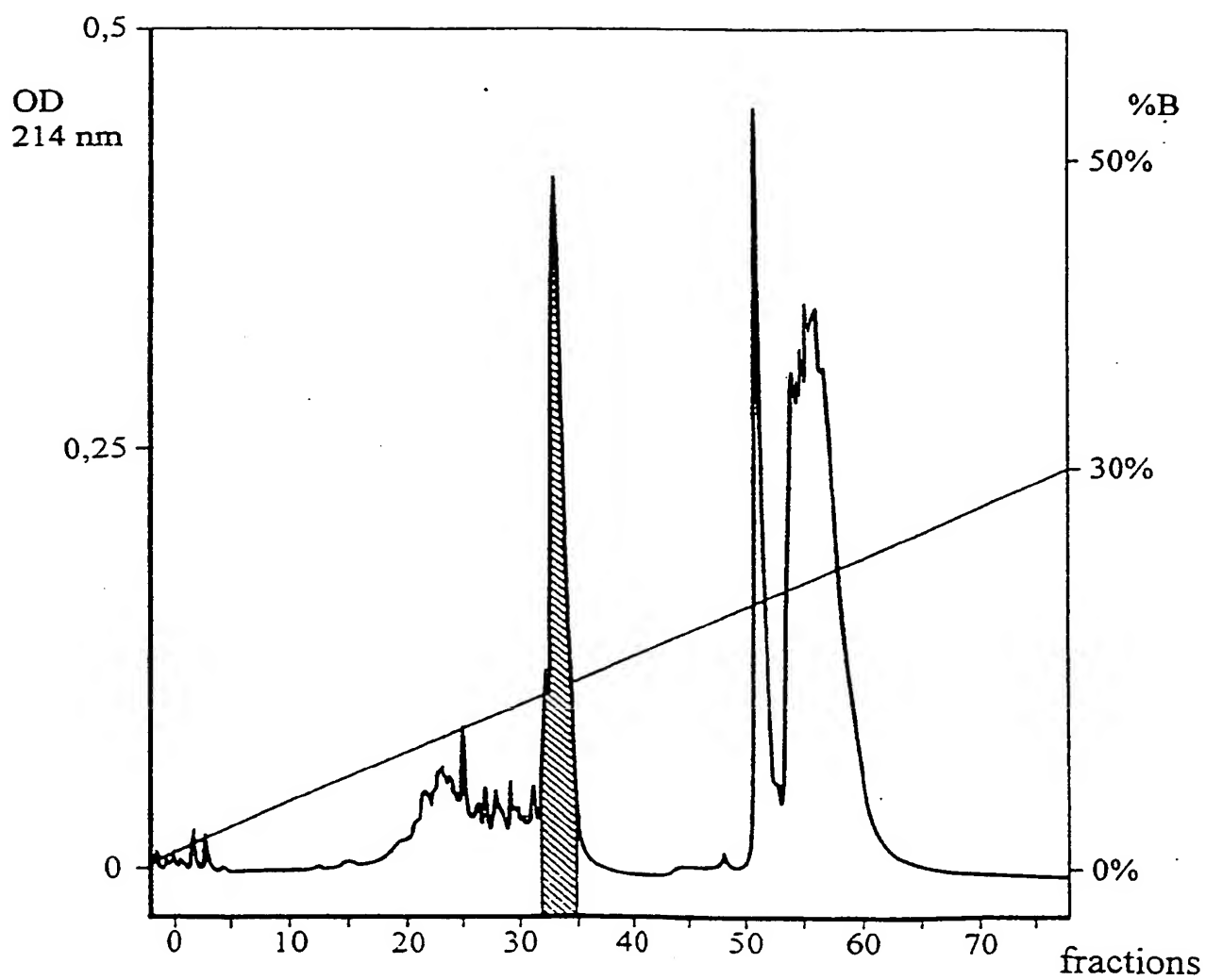


Figur 3b

ERSATZBLATT (REGEL 26)



- 5/5 -



Figur 4

ERSATZBLATT (REGEL 26)



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No  
PCT/EP 94/04282

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/19 C07K14/52 A61K38/19 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,93 13206 (BRITISH BIO-TECHNOLOGY LIMITED) 8 July 1993 ---	
A	THE FASEB JOURNAL, vol.3, December 1989, BETHESDA,MD,USA pages 2565 - 2573 WOLPE ET AL 'MACROPHAGE INFLAMMATORY PROTEINS 1 AND 2:MEMBERS OF A NOVEL SUPERFAMILY OF CYTOKINES' -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 April 1995

Date of mailing of the international search report

11.04.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 94/04282

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9313206	08-07-93	AU-B- 3260493	28-07-93
		CA-A- 2125985	08-07-93
		EP-A- 0627003	07-12-94
		FI-A- 943024	22-06-94
		NO-A- 942380	23-08-94
-----			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 94/04282

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/19 C07K14/52 A61K38/19 G01N33/53

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,93 13206 (BRITISH BIO-TECHNOLOGY LIMITED) 8. Juli 1993 ---	
A	THE FASEB JOURNAL, Bd.3, Dezember 1989, BETHESDA,MD,USA Seiten 2565 - 2573 WOLPE ET AL 'MACROPHAGE INFLAMMATORY PROTEINS 1 AND 2:MEMBERS OF A NOVEL SUPERFAMILY OF CYTOKINES' -----	

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- 'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- 'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- 'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. April 1995

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11-04-1995

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sitch, W



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/04282

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9313206	08-07-93	AU-B- 3260493	28-07-93
		CA-A- 2125985	08-07-93
		EP-A- 0627003	07-12-94
		FI-A- 943024	22-06-94
		NO-A- 942380	23-08-94
-----			

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)